

TAP CHI SINH HOC 2019, 41(1): 45–52

DOI: 10.15625/0866-7160/v41n1.10924

## EXPRESSION OF THE RECOMBINANT SINGLE CHAIN VARIABLE FRAGMENTS RECOGNIZING BLOOD ANTIGEN FUSED WITH THIOREDOXIN IN *Escherichia coli*

Dang Thi Ngoc Ha, Le Thi Thu Hong\*, Truong Nam Hai\*

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, VAST, Vietnam

<sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology, VAST, Vietnam

Received 1 December 2017, accepted 2 February 2019

### ABSTRACT

The technology of recombinant single chain variable fragments (scFvs) expression has been used in research, diagnosis and treatment of diseases. In the previous study, we studied the expression of a recombinant single chain variable fragment recognizing blood A antigen (antiA-scFv) in *E. coli*. However, the protein was insoluble form resulting in difficulty for purification, refolding and activity assesment. Here, we present the study on fused expression of the recombinant scFv - specific blood A antigen with thioredoxin (Trx) in the expression vector pET32a(+). The results showed that the Trx/antiA-scFv fusion protein was expressed with molecular weight of 49 kDa in a soluble form reaching 40% of the total recombinant protein. This result facilitates the optimal condition of soluble protein expression, purification and bioactivity determination of the antiA-scFv recombinant antibody.

**Keywords:** *Escherichia coli*, blood group A, single recombinant proteins, fusion expression, soluble protein, thioredoxin.

*Citation:* Dang Thi Ngoc Ha, Le Thi Thu Hong, Truong Nam Hai, 2019. Expression of the recombinant single chain variable fragments recognizing blood antigen fused with thioredoxin in *Escherichia coli*. *Tap chi Sinh hoc*, 41(1): 45–52. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v41n1.10924>.

\*Corresponding author email: [lethuhong@ibt.ac.vn](mailto:lethuhong@ibt.ac.vn)/[tnhai@ibt.ac.vn](mailto:tnhai@ibt.ac.vn)

©2019 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

## BIỂU HIỆN DUNG HỢP GEN MÃ HÓA KHÁNG THỂ ĐƠN CHUỖI TÁI TỔ HỢP NHẬN BIẾT KHÁNG NGUYÊN NHÓM MÁU VỚI THIOREDOXIN TRONG TẾ BÀO *Escherichia coli*

Đặng Thị Ngọc Hà, Lê Thị Thu Hồng\*, Trương Nam Hải\*

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài 1-12-2017, ngày chấp nhận 2-2-2019

### TÓM TẮT

Công nghệ biểu hiện kháng thể đơn chuỗi tái tổ hợp (scFv) đã được ứng dụng trong nghiên cứu, chẩn đoán và điều trị bệnh. Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã nghiên cứu biểu hiện kháng thể đơn chuỗi nhận biết kháng nguyên nhóm máu A (antiA-scFv) trong tế bào *Escherichia coli*. Tuy nhiên, phân tử kháng thể đơn chuỗi dạng đơn được biểu hiện không tan gây khó khăn cho quá trình tinh sạch, tái cấu trúc và đánh giá hoạt tính. Trong nghiên cứu này, chúng tôi công bố kết quả nghiên cứu biểu hiện kháng thể đơn chuỗi tái tổ hợp nhận biết kháng nguyên nhóm máu ở dạng tan khi dung hợp với thioredoxin trong vector biểu hiện pET32a(+). Protein dung hợp Trx/antiA-scFv đã được tổng hợp trong tế bào *E. coli* với kích thước phân tử 49 kDa và chiếm khoảng 40% ở dạng tan. Kết quả này tạo thuận lợi cho nghiên cứu tối ưu sự biểu hiện dạng tan, thuận lợi cho tinh chế và xác định hoạt tính của antiA-scFv tái tổ hợp.

**Từ khóa:** *Escherichia coli*, biểu hiện dung hợp, kháng thể đơn chuỗi tái tổ hợp, nhóm máu A, thioredoxin, protein tan.

\*Địa chỉ liên hệ email: lethuhong@ibt.ac.vn/tnhai@ibt.ac.vn

### MỞ ĐẦU

Sản xuất kháng thể theo công nghệ tế bào lai đã thu được nhiều thành công và đã được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu, chẩn đoán và điều trị bệnh như là các bệnh tự miễn, nhiễm khuẩn và bệnh ung thư. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp, kháng nguyên tinh khiết không có sẵn để gây miễn dịch, đặc biệt là các kháng nguyên bề mặt hay là các protein màng. Đây là các kháng nguyên rất dễ mất cấu trúc trong quá trình tinh sạch. Ngoài ra, công nghệ tế bào lai cũng bộc lộ hạn chế về cơ chế dung hợp tế bào, sự không bền vững của tế bào lai dùng để sản xuất kháng thể... Hơn nữa, sản xuất kháng thể đơn dòng bằng công nghệ tế bào lai có giá thành cao do môi trường nuôi cấy tế bào động vật

giá cao, điều kiện nuôi cấy và dự trữ tế bào rất nghiêm ngặt.

Nhờ sự phát triển của công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp, hiện nay các phân đoạn kháng thể, kháng thể đơn chuỗi (scFv) có thể được tạo ra trong tế bào *E. coli* (Ahmad et al., 2012, Spadiut et al., 2014). Đây là một hệ biểu hiện được nghiên cứu khá kỹ về đặc tính di truyền, thao tác đơn giản, có khả năng tổng hợp lượng lớn protein ngoại lai với điều kiện nuôi cấy đơn giản và rẻ tiền. Ngoài ra, trong quá trình sản xuất, scFv cũng có thể được cải biến di truyền để làm tăng một số tính chất của phân tử kháng thể như làm tăng tính ái lực và tính đặc hiệu (Song et al., 2014). Cho đến nay, kháng thể đơn chuỗi được ứng dụng rất nhiều trong chẩn đoán (Ahmad et al., 2012). Bên cạnh đó, kháng thể đơn chuỗi có thể được

sử dụng cho mục đích điều chỉnh và phát hiện sự hoạt động của các protein trong tế bào, như vậy phù hợp cho việc sử dụng làm vaccine (Alvarez-Rueda et al., 2009). Ngoài ra, kháng thể đơn chuỗi còn được ứng dụng trong điều trị ung thư (Chester et al., 2004) và chống lại virus bệnh dại glycoprotein (Yuan et al., 2013).

Tuy nhiên, bên cạnh những thuận lợi, hệ biểu hiện này cũng bộc lộ những hạn chế trong nghiên cứu biểu hiện scFv, trong đó phải kể đến sự hình thành thể vùi của phân tử kháng thể, sự tạo thành protein với hoạt tính liên kết thấp, cấu trúc không bền và độc cho tế bào chủ. Do đó, mỗi loại scFv cần nghiên cứu tìm kiếm thiết kế và chủng biểu hiện thích hợp.

Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã công bố kết quả biểu hiện gen mã hóa kháng thể đơn chuỗi antiA-scFv trong vector biểu hiện pET22b(+). Protein antiA-scFv tái tổ hợp đã được tổng hợp trong tế bào *E. coli*. Tuy nhiên, antiA-scFv đã tồn tại ở dạng không tan (Đặng Thị Ngọc Hà và nnk., 2017). Trong bài báo này, chúng tôi công bố kết quả biểu hiện dung hợp mã hóa kháng thể đơn chuỗi nhận biết kháng nguyên nhóm máu A với protein thioredoxin (Trx/antiA-scFv). Protein dung hợp đã được biểu hiện ở dạng tan, thuận lợi cho quá trình tinh sạch và xác định hoạt tính.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Chủng vi sinh vật

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH10b (Invitrogen, Hoa Kỳ) được sử dụng để tách dòng gen, các chủng *E. coli* JM109, BL21 (DE3), Rosseta 2 (Invitrogen, Hoa Kỳ) sử dụng để biểu hiện gen.

### Plasmid

pET22b+/antiA-scFv được sử dụng để nhân dòng gen *antiA-scFv*; Plasmid pET32a+ (Novagen, Hoa Kỳ) là các vector biểu hiện gen.

### Kháng thể

Kháng thể đơn dòng kháng C-myc từ huyết thanh của chuột (Sigma, Hoa Kỳ);

kháng thể kháng IgG-peroxidase chuột (Sigma, Hoa Kỳ).

### Các trình tự môi cho PCR

Mỗi xuôi F - NcoI: 5'-TACCATGGC GCAGGTCCAAGTGCAGC-3'

Mỗi ngược R - XhoI: 5'-TGCTCGAGTT ACAGGTCTTCTTCGC-3'

### Hóa chất, enzyme

Hóa chất, enzyme sử dụng cho nghiên cứu APS, TEMED, Chloroform, Ethidium bromide, Glucose, Glycerol, Glycine, Isoamyl-alcohol, Ethanol, Methanol, Peptone, Yeast Extract, SDS, Tris, Acrylamid, Bis Acrylamide, Agar, Agarose, Coomassie (Merck, Đức); KIT tinh sạch DNA GFX™ (code 28-9034-70, GE Healthcare Life Science, Anh); dNTP, Taq DNA polymerase, Dnase I, T4 DNA – ligase, các enzyme hạn chế (Fermentas, Hoa Kỳ); skim milk của hãng (Difco, Hoa Kỳ); kháng sinh Ampiciline, TMB của hãng (Sigma, Hoa Kỳ).

### PCR khuếch đại đoạn gen *antiA-scFv*

Gen *antiA-scFv* được nhân lên bằng PCR từ vector pET22b+/antiA-scFv dung dịch với thành phần: 18 µl dH<sub>2</sub>O, 2,5 µl đệm 10×2,5 µl dNTP 2 mM, 0,5 µl mỗi xuôi F: NcoI 10 µM, 0,5 µl mỗi ngược R: NcoI 10 µM, 0,5 µl khuôn pET22b+/antiA-scFv, 0,5 µl Taq polymerase. Chương trình PCR: Biến tính 95°C: 3 phút; lặp lại 30 chu kỳ với 3 bước: 94°C: 30 giây; 58°C: 30 giây; 72°C: 60 giây; bước kéo dài 72°C: 10 phút.

### Thiết kế vector biểu hiện pET32a+/antiA-scFv

Gen *antiA-scFv* sau khi được nhân lên bằng PCR được cắt bằng 2 enzyme hạn chế *XhoI* và *NcoI*. Đồng thời, vector pET32a+ cũng được cắt bằng 2 enzyme này. Sản phẩm gen và vector được tinh sạch bằng KIT thôi gel của Qiagen. Đoạn gen *antiA-scFv* được ghép nối với vector biểu hiện pET32a+ bằng enzyme T<sub>4</sub> ligase. Sản phẩm của phản ứng ghép nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH10b bằng phương pháp sốc nhiệt và trải trên môi trường đĩa thạch LB có bổ sung 100 µg/ml ampicillin (LBA) (Sambrook &

W. Russell, 2001). Các dòng biến nạp được tách plasmid và kiểm tra sự có mặt của gen *antiA-scFv* bằng các enzyme hạn chế *XhoI*, *NcoI* và *XbaI*. Vector biểu hiện gen pET32/*antiA-scFv* chọn được được biến nạp vào các chủng biểu hiện.

### Biểu hiện gen *antiA-scFv*

Các chủng *E. coli* BL21 (DE3), JM109, Rosetta mang vector biểu hiện pET32a(+)/*antiA-scFv* được nuôi cấy trong môi trường LBamp, nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C qua đêm. Sau đó, dịch tế bào nuôi qua đêm được chuyển sang môi trường LBA mới với OD<sub>600</sub> khoảng 0,1; nuôi tiếp ở 37°C, lắc 200 vòng/ phút đến khi OD<sub>600</sub> đạt 0,3–0,5. Dịch nuôi cấy được cảm ứng với 0,1 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Studier et al., 1990) và chuyển sang nuôi lắc 200 vòng/ phút ở 20°C trong 16 giờ. Sau lên men, tế bào được thu lại bằng ly tâm 5000 vòng/ phút trong 5 phút và được hòa lại về cùng một mật độ tế bào OD<sub>600</sub>=10 trong đệm 20 mM Tris-HCl, pH = 8. Kiểm tra sự biểu hiện protein tái tổ hợp bằng điện di SDS-PAGE và Western blot.

### Tách chiết protein tái tổ hợp từ tế bào *E. coli*

Tế bào *E. coli* tái tổ hợp sau khi lên men được thu lại bằng ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút. Hòa lại tế bào trong đệm Tris HCl 20 mM, pH=8 để đưa mẫu về OD = 10. Dịch tế bào được siêu âm trong 10 phút (3 giây/xung, nghỉ 3 giây giữa các xung) với cường độ 85 Amp. Sau siêu âm, mẫu được ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút để phân thành pha tan và pha tủa. Pha tủa được hòa lại về thể tích ban đầu trong đệm 20 mM Tris HCl, pH=8. Các mẫu tan và tủa đều được điện di kiểm tra trên gel SDS-PAGE 12,6% (Laemmli, 1970).

### Kiểm tra biểu hiện protein bằng SDS-PAGE và Western blot

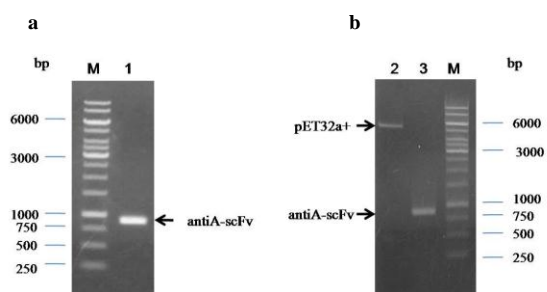
Điện di protein trên gel SDS-PAGE (Laemmli, 1970) và thí nghiệm lai Western blot theo phương pháp đã mô tả (Đặng Thị Ngọc Hà và nnk., 2017). Về cơ bản, protein Trx/*antiA-scFv* tái tổ hợp được nhận biết qua phản ứng lai Western blotting với kháng thể kháng C-myc. Protein sau khi điện di trên gel

SDS-PAGE sẽ được chuyển sang màng PVDF. Sau đó, màng được ủ lần lượt với Skimmilk 5% trong TBS 1x, kháng thể 1 kháng C-myc, kháng thể 2 antimouse IgG-peroxidase trong 1 giờ. Cuối cùng phản ứng lai được hiện màu bằng dung dịch TMB.

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Thiết kế vector biểu hiện pET32/*antiA-scFv*

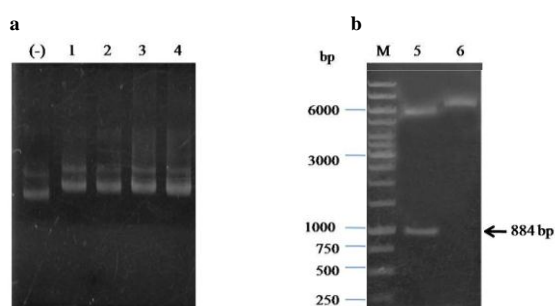
Vector pET32a+ ngoài những ưu điểm của hệ vector pET nó còn chứa trình tự gen mã hóa cho protein thioredoxin (Trx) ngay trước vùng đa nối cùng với trình tự mã hóa His-tag, S-tag. Khi gen được gắn vào vùng đa nối của vector, sản phẩm của quá trình dịch mã sẽ là protein dung hợp trong đó protein tái tổ hợp được gắn với protein Trx và đoạn His-tag, S-tag vì vậy, rất thuận tiện cho việc tinh sạch protein sau này. Ngoài ra, protein Trx có chức năng trong việc khử các gốc cysteine được oxy hóa, như vậy có thể giúp làm giảm sự kết tụ của các protein và dẫn đến làm tăng tính tan của các protein tái tổ hợp (Nakamura et al., 1997).



**Hình 1.** Kết quả kiểm tra gen *antiA-scFv* và vector pET32a+: a. Sản phẩm khuếch đại gen *antiA-scFv*; b. Sản phẩm cắt vector pET32a+ và gen *antiA-scFv* bằng enzyme hạn chế *XhoI* + *NcoI*. Đường chạy M: thang DNA chuẩn 1kb (Fermentas). Đường chạy 1: Sản phẩm tinh sạch gen *antiA-scFv*. Đường chạy 2, 3: Lần lượt là sản phẩm cắt vector pET32a+, gen *antiA-scFv* bằng enzyme hạn chế *XhoI* + *NcoI*

Để đưa gen *antiA-scFv* vào vector biểu hiện pET32a+, chúng tôi đã khuếch đại đoạn gen này từ plasmid pET22b+/*antiA-scFv* bằng cặp mồi đặc hiệu F-*NcoI* và R-*XhoI*. Sản

phẩm khuếch đại gen *antiA-scFv* là một băng duy nhất và sắc nét có kích thước khoảng 882 bp (hình 1a). Đoạn gen *antiA-scFv* sau đó được ghép nối với vector biểu hiện pET32a+. Để có thể gắn được gen *antiA-scFv* vào vector biểu hiện pET32a+ thì vector pET32a+ và đoạn gen *antiA-scFv* đều được xử lý bằng enzyme hạn chế *Xho* I và *Nco* I. Sau khi xử lý bằng enzyme hạn chế, chúng tôi đã tinh sạch đoạn gen và vector bằng KIT tinh sạch Qiagen (hình 1b). Kết quả kiểm tra sản phẩm cho thấy, sau khi tinh sạch đoạn gen và vector đã thu được một băng duy nhất và có thể dùng để ghép nối với nhau.



**Hình 2.** Kiểm tra kết quả tạo plasmid tái tổ hợp pET32a+/antiA-scFv: a. Kết quả tách dòng plasmid sản phẩm lai pET32a+ và gen *antiA-scFv*; b. Sản phẩm cắt kiểm tra plasmid bằng các enzyme hạn chế *Xho*I + *Nco*I và *Xba*I. Đường chạy (-): pET32a+ không mang gen. Đường chạy 1, 2, 3, 4: lần lượt là plasmid tách từ các dòng khuẩn lạc khác nhau. Đường chạy M: Thang DNA chuẩn 1 Kb. Đường chạy 5, 6: lần lượt là sản phẩm cắt pET32a+/antiA-scFv bằng enzyme *Xho*I + *Nco*I và enzyme *Xba*I

Đoạn gen *antiA-scFv* được ghép nối vào vector pET32a+. Kết quả biến nạp sản phẩm lai cho thấy trên đĩa LBA xuất hiện nhiều khuẩn lạc màu trắng đục, tròn và bóng. Lựa chọn một số dòng khuẩn lạc để tách plasmid, điện di kiểm tra (hình 2a). Kết quả cho thấy tất cả các mẫu plasmid tách từ các dòng 1, 2, 3, 4 đều cao hơn dòng đối chứng là pET32a+ không mang gen. Như vậy, có khả năng đoạn gen *antiA-scFv* đã được chèn vào vector pET32a+.

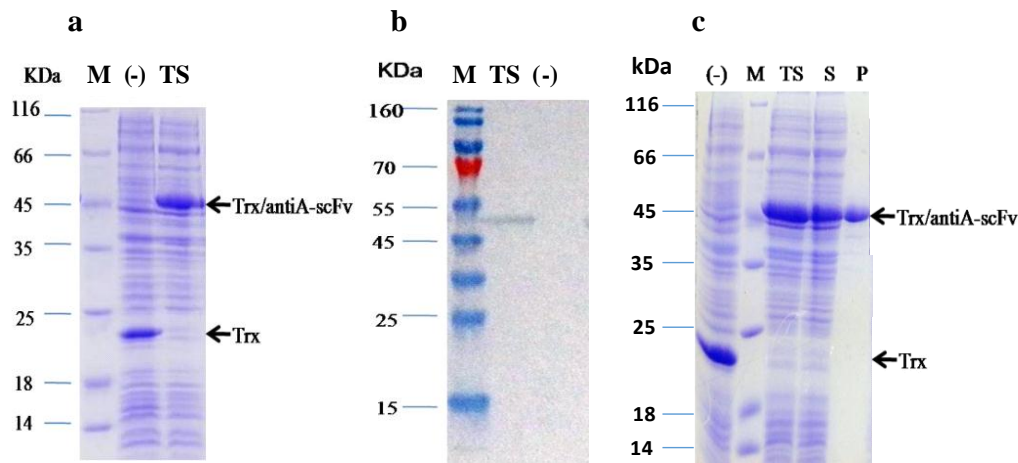
Để có thể kết luận chính xác đã tạo được vector tái tổ hợp pET32a+/antiA-scFv, chúng tôi đã chọn dòng plasmid để cắt kiểm tra bằng các enzyme hạn chế *Xba* I, *Xho* I và *Nco* I. Theo lý thuyết, trên vector pET32a+ có chứa một điểm cắt của enzyme *Xba* I, trong trình tự gen *antiA-scFv* không chứa điểm cắt của enzyme này nên khi cắt pET32a+/antiA-scFv bằng *Xba* I vector này sẽ được cắt mở vòng. Ngoài ra, trên vector pET32a+ có chứa 1 điểm cắt của *Xho* I và 1 điểm cắt của *Nco* I ngay tại vị trí chèn gen *antiA-scFv* nên khi cắt bằng cả hai enzyme này sẽ tạo ra đoạn gen có kích thước khoảng 884 nucleotide. Kết quả điện di trên hình 2b cho thấy, khi cắt plasmid tái tổ hợp bằng enzyme *Xho* I + *Nco* I, trên đường chạy 5 xuất hiện 2 băng DNA trong đó có 1 băng có kích thước khoảng 884 bp. Trên đường chạy 6 chỉ xuất hiện 1 băng duy nhất có kích thước khoảng gần 7.000 bp, chứng tỏ plasmid chỉ được cắt mở vòng. Với kết quả kiểm tra trên, chúng tôi có thể khẳng định gen *antiA-scFv* đã được chèn vào vector pET32a+ (được đặt tên là pET32a+/antiA-scFv).

### Biểu hiện protein dung hợp Trx/antiA-scFv

Sau khi thiết kế được vector biểu hiện mang gen *antiA-scFv* chúng tôi đã biến nạp plasmid tái tổ hợp vào các chủng biểu hiện *E. coli* BL21 (DE3), JM109, Rossetta 2. Gen *antiA-scFv* trong các plasmid tái tổ hợp hoạt động dưới sự điều khiển của promoter T7. Promoter này được kiểm soát chặt chẽ bởi chất cảm ứng IPTG (Studier, 2005). Theo lý thuyết, protein Trx/antiA-scFv (dạng dung hợp với Trx khi biểu hiện trong pET32a+) có kích thước khoảng 49 kDa. Với điều kiện môi trường LBA, cảm ứng 0,1 mM IPTG khi OD<sub>600</sub> đạt khoảng 0,4, sau đó nuôi cảm ứng ở 20°C, thu mẫu sau 16 giờ nuôi cấy, kết quả biểu hiện Trx/antiA-scFv trong chủng JM109 được thể hiện trên hình 3a cho thấy protein biểu hiện tổng số của dòng tái tổ hợp xuất hiện một băng protein đậm nét có kích thước đúng như dự đoán. Trong khi các đường chạy đối chứng âm là mẫu biểu hiện protein tổng số chứa vector không mang gen không xuất hiện các băng đậm nét có kích thước như vậy. Bên cạnh đó, chúng tôi cũng đã kiểm tra biểu hiện của antiA-scFv trong chủng BL21(DE3) và

Rosetta 2 trong cùng điều kiện như JM109. Kết quả biểu hiện Trx/antiA-scFv trong chủng BL21 (DE3) cho thấy protein Trx/antiA-scFv biểu hiện rất kém. Trong chủng Rosetta 2, Trx/antiA-scFv biểu hiện tương đối tốt (kết quả không được trình bày). Như vậy, chủng biểu hiện đóng vai trò quan trọng trong việc tăng năng suất protein tái tổ hợp mong muốn. Kết quả này cũng phù hợp với kết luận của Joseph et al. (2015). Đồng thời, chúng tôi

cũng nhận thấy quá trình biểu hiện dung hợp của protein ngoại lai với các yếu tố Trx, SUMO trong *E. coli* giúp cải thiện đáng kể năng suất protein. Nhận định này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu biểu hiện kháng thể đơn chuỗi nhận biết VEGF 165 dung hợp với SUMO (Ye et al., 2008) và nghiên cứu biểu hiện kháng thể đơn chuỗi dung hợp với thioredoxin trong tế bào chất của *E. coli* (Jurado et al., 2006).



Hình 3. Kiểm tra sự biểu hiện protein Trx/antiA-scFv trong chủng *E. coli*: a. SDS-PAGE, b. Western blot với c-myc, c. Kiểm tra mẫu protein ở pha tan và không tan; Đường chạy M: Thang protein chuẩn (Fermentas); (-): Đối chứng âm, vector không mang gen; TS: Mẫu tổng số; S: Pha tan; P: Pha tủa

Để khẳng định chắc chắn protein trên là protein tái tổ hợp mong muốn, ngoài việc xác định protein biểu hiện qua băng điện di trên gel SDS-PAGE chúng tôi đã tiến hành kiểm tra bằng kỹ thuật lai miễn dịch Western blot. Dựa trên thiết kế gen *antiA-scFv* có chứa một vùng trình tự mã hóa C-myc để hỗ trợ xác định sự biểu hiện protein tái tổ hợp. Các mẫu biểu hiện protein tái tổ hợp dạng dung hợp Trx/antiA-scFv được lai với kháng thể C-myc sản xuất từ chuột và kháng thể hai là kháng thể kháng IgG-peroxidase của chuột. Như vậy, chỉ có protein nào có C-myc mới có thể bắt đặc hiệu với kháng thể C-myc và xuất hiện trên màng lai.

Kết quả Western blot trên hình 3b cho thấy, trên đường chạy protein từ chủng tái tổ hợp có xuất hiện băng protein có kích thước khoảng 49 kDa. Đó chính là vị trí băng tương

ứng của protein dạng dung hợp Trx/antiA-scFv. Trên đường chạy mẫu đối chứng âm không mang gen *antiA-scFv* không thấy băng nào xuất hiện. Như vậy, chúng tôi đã thiết kế và biểu hiện thành công protein antiA-scFv dạng dung hợp cùng Trx trong vector pET32a+.

Các protein chỉ thể hiện được hoạt tính khi tồn tại ở dạng tan. Tuy nhiên, hầu như protein có nguồn gốc từ tế bào nhân chuẩn được tổng hợp bởi hệ biểu hiện *E. coli* thường tồn tại ở dạng không tan. Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã kiểm tra tính tan của protein antiA-scFv biểu hiện dạng đơn trong các chủng Rosetta2 và JM109. Kết quả kiểm tra cho thấy, Trx/antiA-scFv biểu hiện dạng đơn trong chủng Rosetta2 hoàn toàn ở trạng thái không tan (Đặng Thị Ngọc Hà và nnk., 2017). Có thể do sự biểu hiện quá mức của protein



trong chủng này dẫn đến sự hình thành không đúng các cầu nối disulfide của protein tái tổ hợp (Joseph et al., 2015). Ở đây, dựa vào mức độ đậm của băng protein được quan sát trên SDS-PAGE của các mẫu sau khi phân tách pha tan và pha tủa cho thấy protein dung hợp Trx/antiA-scFv tái tổ hợp dạng tan chiếm tỷ lệ khoảng 40% tổng số Trx/antiA-scFv được tạo ra (hình 3c). Kết quả này là cơ sở cho nghiên cứu tối ưu biểu hiện protein ở dạng tan.

Theo các nghiên cứu, sự hạn chế trong quá trình biểu hiện kháng thể tái tổ hợp trong *E. coli* là do trong cấu trúc phân tử kháng thể có các cầu nối disulfide. Sự hình thành không đúng cấu trúc disulfide sẽ dẫn đến sự biểu hiện protein ở dạng thể vùi và làm mất đi hoạt tính sinh học của protein. Trong khi đó, mỗi phân tử kháng thể cần quá trình gấp chính xác của hai cầu disulfide để có thể thực hiện chức năng liên kết kháng nguyên của nó (Glockshuber et al., 1992). Vì vậy, sự biểu hiện dung hợp cùng Trx, MBP, GST... sẽ giúp cải thiện khả năng tan cũng như năng suất của protein ngoại lai khi sản xuất trong tế bào *E. coli* (LaVallie & McCoy, 1995). Paola Jurado et al. (2006) cũng đã nghiên cứu và cho thấy vai trò cải thiện khả năng tan của kháng thể tái tổ hợp sản xuất trong tế bào chất của *E. coli* khi dung hợp cùng Trx. (Jurado et al., 2006).

## KẾT LUẬN

Protein antiA-scFv trong thiết kế dung hợp Trx/antiA-scFv được biểu hiện thành công ở dạng tan trong chủng JM109 trong môi trường LBA, cảm ứng 0,1 mM IPTG khi OD600 đạt khoảng 0,4 và nuôi cảm ứng ở 20°C, thu mẫu sau 16 giờ nuôi cấy. Kết quả này là cơ sở cho nghiên cứu tối ưu biểu hiện protein dung hợp cho tính chế và xác định hoạt tính của kháng thể đơn chuỗi tái tổ hợp antiA-scFv.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hỗ trợ về kinh phí của đề tài cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam “Nghiên cứu tạo kháng thể đơn chuỗi tái tổ hợp nhận biết đặc hiệu kháng nguyên nhóm máu”, mã số VAST02.03/15-16 và trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Gen.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad Z. A., Yeap S. K., Ali A. M., Ho W. Y., Alitheen N. B. M, Hamid M., 2012. ScFv antibody: Principles and clinical application. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012: 1–15.
- Alvarez-Rueda N., Ladjemi M. Z., Behar G., Cognac S., Pugniere M., Roquet F., Bascoul-Mollevi C., Baty D., Pelegrin A., Navarro-Teulon I., 2009. A llama single domain anti-idiotypic antibody mimicking HER2 as a vaccine: Immunogenicity and efficacy. *Vaccine*, 27(35): 4826–4833.
- Chester K., Pedley B., Tolner B., Violet J., Mayer A., Sharma S., Boxer G., Green A., Nagl S., Begent R., 2004. Engineering Antibodies for Clinical Applications in Cancer. *Tumor Biol.*, 25(1–2): 91–98.
- Glockshuber R., Schmidt T., Pluckthun A., 1992. The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding in vitro, and functional expression in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 31(5): 1270–1279.
- Đặng Thị Ngọc Hà, Nguyễn Thị Trung, Lê Thị Thu Hồng, Đỗ Thị Huyền, Trương Nam Hải, 2017. Nghiên cứu lựa chọn điều kiện biểu hiện kháng thể đơn chuỗi tái tổ hợp nhận biết kháng nguyên nhóm máu A trong chủng *Escherichia coli*. *Tạp chí Sinh học*, 39(2): 191–198.
- Joseph B. C., Pichaimuthu S., Srimeenakshi S., 2015. An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Cell Sci. Ther.*, 6(5): 1–7.
- Jurado P., de Lorenzo V., Fernandez L. A., 2006. Thioredoxin fusions increase folding of single chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*: evidence that chaperone activity is the prime effect of thioredoxin. *J. Mol. Biol.*, 357(1): 49–61.
- Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.

- LaVallie E. R., McCoy J. M., 1995. Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6(5): 501–506.
- Nakamura H., Nakamura K., Yodoi J., 1997. Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.*, 15: 351–369.
- Sambrook J., W Russell D., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb. NY. 999
- Song H. N., Jang J. H., Kim Y. W., Kim D. H., Park S. G., Lee M. K., Paek S. H., Woo E. J., 2014. Refolded scFv antibody fragment against myoglobin shows rapid reaction kinetics. *Int. J. Mol. Sci.*, 15(12): 23658–23671.
- Spadiut O., Capone S., Krainer F., Glieder A., Herwig C., 2014. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. *Trends Biotechnol.*, 32(1): 54–60.
- Studier F. W., 2005. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.*, 41(1): 207–234.
- Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Dubendorff J. W., 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, 185: 60–89.
- Ye T., Lin Z., Lei H., 2008. High-level expression and characterization of an anti-VEGF165 single-chain variable fragment (scFv) by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81(2): 311–317.
- Yuan R., Chen X., Chen Y., Gu T., Xi H., Duan Y., Sun B., Yu X., Jiang C., Liu X., Wu C., Kong W., Wu Y., 2013. Preparation and diagnostic use of a novel recombinant single-chain antibody against rabies virus glycoprotein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(4): 1547–1555.